

# Indice

<b>RELAZIONE FINALE VERSIONE INTEGRALE</b>	<b>4</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>2 MATERIALE E METODI (max 10 pagine)</b>	<b>9</b>
2.1 Campionamento . . . . .	9
2.2 Esami microbiologici . . . . .	9
2.3 Antibigrammi . . . . .	9
2.4 Analisi metagenomiche . . . . .	11
2.5 Analisi dei dati . . . . .	12
<b>3 RISULTATI</b>	<b>18</b>
3.1 QUADRO GENERALE . . . . .	18
3.2 PREVALENZA, TRA LA FAUNA SELVATICA, DI ANIMALI PORTATORI DI CEPPI ANTIBIOTICO-RESISTENTI . . . . .	19
3.3 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA DEGLI ISO- LATI BATTERICI . . . . .	20
3.4 POOL METAGENOMICI . . . . .	22
<b>4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI (max 10 pagine)</b>	<b>23</b>
<b>5 Raccomandazioni (max 2 pagine)</b>	<b>24</b>
<b>6 MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI (1 pagina)</b>	<b>24</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>34</b>

## Elenco delle figure

1	Andamento annuale del numero di pubblicazioni relative all'AMR nella fauna selvatica. . . .	25
---	---	----

2	DAG-Direct Acyclic Graph: secondo il modello qui specificato, la probabilità di Resistenza è dipendente dalla Specie di provenienza dei campioni, dalla superficie del comune dedicata al Pascolo e dal grado di Urbanizzazione. Sia la Specie che frequenta un determinato comune che il Pascolo sono dipendeni dal grado di Urbanizzazione. Specie e Pascolo sono indipendenti condizionalmente al grado di Urbanizzazione. . . . .	26
3	Comuni di provenienza dei campioni . . . . .	26
4	distribuzione numero di resistenze al panel di antibiotici . . . . .	27
5	Distribuzione a posteriori delle stime di prevalenza di animali carrier di ceppi antibiotico-resistenti nei diversi gruppi-specie . . . . .	27
6	Distribuzione a posteriori delle stime di prevalenza di animali carrier di ceppi multi-resistenti nei diversi gruppi-specie . . . . .	28

## Elenco delle tabelle

1	Caratterizzazione dei comuni di provenienza dei campioni . . . . .	28
2	Distribuzione del numero di campioni di feci in base alle differenti specie di fauna selvatica di origine, raggruppati per il gruppo-specie di appartenenza . . . . .	29
3	Distribuzione del numero di campioni di feci in base alle caratteristiche territoriali di provenienza per i differenti gruppo-specie di appartenenza (NM= Non Montani, P= Parzialmente Montani, T= Totalmente Montani) . . . . .	30
4	Distribuzione del numero di campioni di feci in base al grado di urbanizzazione dei comuni di provenienza per i differenti gruppo-specie di appartenenza (UA= Urbanizzazione ALta, UM= Urbanizzazione Media, UB= Urbanizzazione Bassa) . . . . .	30
5	Distribuzione del numero e proporzione di ceppi della famiglia Enterobacteriaceae suddivise per genere, isolati dai 671 campioni di feci analizzati) . . . . .	31
6	Stime della prevalenza di campioni resistenti suddivisi per gruppo-specie: R= numero di campioni resistenti, N= numero campioni esaminati, Prevalenza = media della distribuzione beta, inf-HPD= valore inferiore dell'intervallo HPD, sup-HPD = valore superiore dell'intervallo HPD) . . . . .	32

7	Stime della prevalenza di campioni multi-resistenti suddivisi per gruppo-specie: MR= numero di campioni resistenti, N= numero campioni esaminati, Prevalenza = media della distribuzione beta, inf-HPD= valore inferiore dell'intervallo HPD, sup-HPD = valore superiore dell'intervallo HPD)	32
8	Confronto tra modelli mediante K-fold cross-validation	33

## ELENCO DEI COLLABORATORI

- **Dr. Tranquillo Vito** U.O. 1-Responsabile scientifico del progetto.Coordinamento delle U.O., Analisi statistica dei dati fenotipici.
- **Dr. Fiocchi Alfredo** U.O. 1-Analisi microbiologiche e antibiogrammi.
- **Dr. Pongolini Stefano** U.O. 2-Coordinamento U.O. e attività di analisi metagenomiche
- **Dr. Bolzoni Luca** U.O. 2-Attività analisi metagenomiche
- **Dr. Erika Scaltriti** U.O. 2-Attività analisi metagenomiche
- **Dr. Bertoletti Irene** U.O. 3-Analisi Microbiologiche e antibiogrammi
- **Dr. Alessandro Bianchi** U.O. 3-Analisi Microbiologiche e antibiogrammi
- **Dr. Loris Alborali** U.O. 4-Analsi genomiche ceppi Cefotiofur resistenti
- **Dr. Prati Paola** U.O. 5- Attività di raccolta e invio campioni a U.O.1 per successive analisi
- **Dr. Gianni Sala** U.O. 6- Attività di raccolta e invio campioni a U.O.1 per successive analisi

# RELAZIONE FINALE VERSIONE INTEGRALE

## 1 INTRODUZIONE

L'Antibiotico-Resistenza (AR) è una grave minaccia per la salute in quanto compromette la capacità di trattare le infezioni sia in medicina umana che veterinaria. La resistenza agli antibiotici si sviluppa attraverso complessi meccanismi come la mutazione sotto la pressione selettiva, derivante dall'uso/abuso di antibiotici nel trattamento delle forme infettive batteriche o all'uso metafilattico o come promotori della crescita in zootecnia (pratica oramai illegale nella EU). La diffusione dell'antibiotico-resistenza è attribuita a scambi di DNA inter e intra-specifici, principalmente attraverso il trasferimento orizzontale di geni di resistenza localizzati su plasmidi che rappresenta il più importante meccanismo all'origine dell'acquisizione della resistenza in batteri patogeni rilevanti per la salute umana (Carattoli [2013](#)).

La principale strategia per ridurre l'incidenza del fenomeno antibiotico-resistenza si basa sulla riduzione dell'uso degli antibiotici sia nell'uomo che negli animali domestici, considerando che risulta chiaro che entrambi i comparti sono strettamente collegati e copartecipano al mantenimento e alla diffusione di batteri resistenti e di geni di resistenza (Angulo, Nargund, and Chiller [2004](#)). Queste misure si basano sul presupposto che la resistenza antimicrobica è associata a costi energetici che riducendo le performance riproduttive consentono ai batteri sensibili di superare quelli resistenti, quando non esiste una pressione selettiva legata ai farmaci antimicrobici, anche se sembra che questi costi siano estremamente variabili (Andersson and Hughes [2010](#)) e possano essere ridotti o addirittura trasformati in benefici per il fitness da mutazioni compensative (Luo et al. [2005](#)).

Va ricordato che batteri portatori di geni di resistenza si trovano naturalmente nei suoli in assenza di farmaci antimicrobici antropogenici a causa della produzione naturale di molecole antibiotiche da parte di alcuni batteri e funghi (Knapp [2013](#)). Il serbatoio di geni di resistenza nell'ambiente è quindi un mix di resistenza naturale e quella dovuta alle deiezioni di animali e uomini, a cui si possono aggiungere gli effetti selettivi di inquinanti, che possono co-selezionare elementi genetici mobili che trasportano più geni di resistenza. A questo proposito è stato stabilito che anche basse concentrazioni di antibiotici e metalli pesanti possono avere attività selettiva e indurre antibiotico-resistenza (Baker-Austin et al. [2006](#); Gullberg et al. [2011](#); Kohanski, DePristo, and Collins [2010](#)). La contaminazione ambientale dei determinanti di antibiotico-resistenza, può contribuire all'insorgenza e proliferazione di patogeni difficili o addirittura impossibili da trattare. In considerazione del potenziale impatto negativo sia sulla salute che economico della proliferazione ambientale di batteri antibiotico-resistenti, molti ricercatori, in linea con l'approccio One Health (Robinson

et al. 2016) includono nelle valutazioni dell'antibiotico resistenza, anche la contaminazione ambientale del suolo, dell'acqua e della fauna selvatica (Allen et al. 2010).

I dati disponibili mostrano che numerose specie di animali selvatici sono portatori di batteri antimicrobici resistenti in una vasta gamma di habitat, il che solleva la questione del loro ruolo nelle dinamiche di diffusione e mantenimento all'interfaccia tra popolazioni umane, animali domestici ed ecosistemi naturali. La presenza nella fauna selvatica, normalmente non sottoposta a trattamenti antibiotici, di ceppi batterici resistenti e in generale di geni di resistenza, è verosimilmente attribuibile a fenomeni di contaminazione ambientale. Per definire il ruolo della fauna selvatica nel complesso meccanismo di diffusione e mantenimento dell'antibiotico resistenza è necessario acquisire informazioni relativamente a: quali specie di batteri sono le più frequentemente trovate resistenti ai farmaci antimicrobici nei vertebrati selvatici e la loro caratterizzazione fenotipica e soprattutto genotipica; in che modo le specie selvatiche vengono colonizzate da batteri antibiotico-resistenti e quali scambi di tali batteri avvengono tra l'uomo, gli animali domestici e la fauna selvatica; cosa caratterizza gli habitat più contaminati da batteri antibiotico-resistenti e infine quali tratti ecologici favoriscono la colonizzazione e la potenziale infezione da batteri antibiotico-resistenti nella fauna selvatica ((Vittecoq et al. 2016)).

L'interesse per il ruolo della fauna selvatica nella diffusione e nel mantenimento dell'antibiotico-resistenza è aumentato nel corso degli ultimi 10 anni, con un costante aumento della produzione scientifica, come evidenziato in (Fig1). La principale preoccupazione nasce dal timore che l'eventuale dimostrazione di un ruolo della fauna selvatica come “serbatoio” e “mantenimento” di batteri portatori di geni di resistenza, contribuendo alla contaminazione ambientale di batteri resistenti o materiale genetico di resistenza (resistoma), possa compromettere gli sforzi messi in atto, soprattutto in questi ultimi anni, in campo medico e veterinario per ridurre la diffusione del fenomeno della resistenza agli antibiotici.

Una scoping review pubblicata nel 2015 (Greig et al. 2015), ha evidenziato la presenza di 866 articoli di ricerca primaria; Oltre il 90% erano studi osservazionali; la maggioranza riportano i dati di prevalenza per AR nella fauna selvatica (551/866, 63.6%). Ci sono stati 176 di 866 (20,3%) studi di genotipizzazione. AR è stata più frequentemente studiata in *E. coli* 150 di 866 (17,3%), *Salmonella* 83 di 866 (9,6%) e *Enterococcus* 48 di 866 (5,5%). I gruppi della fauna selvatica più frequentemente studiati erano uccelli 410 su 866 (47,3%), cervidi, 133 di 866 (15,4%) e roditori 91 di 866 (10,5%). Solo 11 articoli hanno studiato la contaminazione dei prodotti La contaminazione ambientale è stata più frequentemente riportata per l'acqua 130 di 866 (15%). Le modalità di trasmissione dell'AR è stata riportata in 110 articoli (12,7%). Tra le caratteristiche ambientali che sono state segnalate come fattori di rischio per il trasferimento di batteri patogeni e /o AR vi sono: condivisione di ambienti 161 di 866 (18,6%), infestazione o mancanza di controllo degli uccelli selvatici

124 di 866 (14,3%) e delle fonti idriche condivise 98 di 866 (11,3%). Le pratiche di mitigazione, strategie o programmi per ridurre la trasmissione di batteri e / o AR sono stati discussi o studiati in 124 su 866 (14,3%) articoli. Sono state fornite informazioni circa i tassi di contatto tra fauna selvatica e animali domestici in 29 articoli (3,3%). È interessante notare che numerosi articoli di ricerca primaria (122/866, 14.1%) hanno riportato associazioni per i fattori di rischio di trasmissione di AR o batteri patogeni dalla fauna selvatica agli animali cibo, fonti ambientali o umani.

Uno dei primi lavori in Italia sull'AR nella fauna selvatica è stato condotto da (Pagano et al. [1985](#)) in ruminanti selvatici e marmotte del parco Nazionale dello Stelvio, in cui su 121 campioni di feci esaminati furono individuati 17 ceppi di E.coli antibiotico-resistenti. Nel 1991 (Caprioli et al. [1991](#)) su 81 campioni di feci da mammiferi selvatici (ruminanti, marmotta) del Parco Nazionale dello Stelvio sono stati osservati complessivamente 18 ceppi di E.coli antibiotico-resistenti. I ceppi isolati hanno mostrato un profilo di multiresistenza. Gli Autori hanno concluso che i ceppi di E. coli in animali selvatici possono essere resistenti a diversi agenti antimicrobici e portatori di plasmidi R, anche se il microbioma intestinale degli animali selvatici non è direttamente esposta agli antibiotici. Così una possibile fonte di AR in E.coli potrebbe essere quegli esseri umani e animali domestici che portano AMRB e condividono gli stessi habitat (turisti, animali domestici pascolo) di animali della fauna selvatica.

Più recentemente sono stati pubblicati nuovi lavori che riguardano la presenza di antibiotico-resistenza in feci di animali selvatici in varie regioni d'Italia con particolare riferimento alle Enterobatteriacee e in particolare E.coli come microrganismo target.

Giacopello et al. ([2016](#)) hanno condotto nel 2013 uno studio osservazionale su 55 tamponi cloacali di diverse specie di avifauna selvatica raccolti da animali ospitati per varie cause presso un centro di recupero per volatili feriti della provincia di Messina. Dai tamponi sono stati isolati 83 ceppi appartenenti alle Enterobacteriacee sottoposti a test di suscettibilità ad un pannello di 16 antibiotici. La resistenza a Trimethoprim/Sulfamethoxazolo è risultata la più frequente fino ad un massimo dell'100% nel gruppo dei passeriformi, del 94% negli uccelli volatili e dell'84% nei rapaci. Importanti livelli di resistenza sono stati osservati anche nei confronti di streptomycin, amoxicillina/clavulanico e ampicillina. I livelli di suscettibilità più elevati sono stati osservati verso antibiotici della famiglia delle cefalosporine. Sono state osservate differenze nel profilo di resistenza dei diversi gruppi tassonomici di avifauna indagata.

Camarda et al. ([2006](#)) riportano i risultati di uno studio osservazionale su 48 ceppi di Escherichia coli isolati da tamponi cloacali, raccolti nel 2002, in una colonia stanziale nella baia di Gallipoli (Lecce) di esemplari di Gabbiano corso (*Larus audouinii*). I test di suscettibilità hanno mostrato una resistenza mediamente scarsa

con oltre il 50% dei ceppi suscettibili a tutto il panel di antibiotici testati, il 30% resistente ad un solo antibiotico e il restante 20% resistente a 2 o più antibiotici.

Foti et al. (2011) hanno condotto uno studio osservazionale nel 2006 su campioni di uccelli migratori durante il loro passaggio sopra il territorio di Ustica in Sicilia. Sono stati raccolti 218 tamponi cloacali e 21 contenuti intestinali provenienti da soggetti rinvenuti morti. Sono stati isolati 183 ceppi di batteri appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae e quasi tutti hanno mostrato un'elevata frequenza di suscettibilità al panel di antibiotici utilizzato. Le maggiori resistenze sono state osservate nei confronti di Ampicillina, Amoxicillina-Acido Clavulanico e Streptomina.

Sempre Foti et al. (2017) in uno studio osservazionale nel 2010 durante la migrazione annuale dei passeriformi nel territorio di Metaponto in Basilicata, hanno raccolto 121 tamponi cloacali di soggetti appartenenti all'ordine dei passeriformi da cui sono stati isolati 122 ceppi di Enterobacteriaceae. Lo studio di suscettibilità agli antibiotici ha mostrato una rilevante frequenza (superiore al 50%) di fenotipi di resistenza in particolare nei confronti di Ampicillina, Amoxicillina, Rifampicina e Amoxicillina-Acido Clavulanico. Rilevante è risultato di circa il 25% dei ceppi resistenti a Imipenem e circa il 7% di ceppi resistenti a Meropenem.

Uno studio osservazionale condotto nel territorio del Parco Nazionale dell'Aspromonte in Calabria nel periodo dal 2015-2017 da Foti et al. (2018) ha permesso di studiare la diffusione dell'antibiotico-resistenza in ceppi di Enterobacteriaceae da mammiferi selvatici (Volpe, Mustelidi, Gatto selvatico e Lupo) utilizzando campioni di feci raccolti direttamente dall'ambiente. Sono stati isolati 221 ceppi di Enterobacteriaceae che hanno mostrato importanti frequenze di antibiotico-resistenza nei confronti di un panel di 20 antibiotici appartenenti a 10 differenti classi. In particolare viene sottolineato l'alta frequenza di ceppi resistenti al gruppo delle penicilline (amoxicillina, ampicillina e amoxicillina-ac.clavulanico), alle tetracicline e agli aminoglicosidi.

Bonardi et al. (2018) nel 2017-18 hanno condotto uno studio con l'obiettivo di evidenziare la presenza di *Escherichia coli* ESBL produttori a partire da isolati di *E.coli* da linfonodi mesenterici di Cinghiali, abbattuti nella provincia di Parma. Un solo ceppo di *Escherichia coli* su 108 esaminati, è risultato ESBL produttore dal punto di vista fenotipico e confermato genotipicamente attraverso l'evidenziazione del gene *bla<sub>TEM</sub>*.

Turchi et al. (2019) nel 2017 hanno condotto uno studio osservazionale nel Parco Regionale delle Alpi Apuane in Toscana, focalizzando l'attenzione sul profilo fenotipico e genotipico di 71 ceppi di *Escherichia coli* isolati da 85 campioni di feci di mammiferi selvatici di diverse specie tra cui ungulati, carnivori e lagomorfi. La più alta frequenza di antibiotico-resistenze è stata osservata fenotipicamente in cefalotina (39%) e ampicillina (34%). Il 39% dei ceppi sono risultati negativi ai test d'identificazione dei geni di resistenza.

L'attività routinaria nel periodo tra il 2002 e il 2016 (anno di presentazione di questo progetto di ricerca) presso l'IZSLER mostra che sono stati eseguiti 404 antibiogrammi di ceppi di batteri isolati da animali selvatici. Tutti questi ceppi mostrano resistenza ad almeno un antibiotico. Nel 96% si è osservata multi-resistenza; 77% erano ceppi di *Salmonella* spp isolati da oltre 300 cinghiali. *E. coli* è stato il secondo ceppo più analizzato (51). Tra le altre specie di fauna selvatica indagate ci sono: 27 ruminanti, 22 uccelli, 42 lepri, 2 volpi e un riccio. Questi dati sono indicativi della presenza e della circolazione di batteri antibiotico-resistente e geni di antibiotico-resistenza nella fauna selvatica della Lombardia.

Sulla base di questi dati è stato progettato un studio osservazionale con l'obiettivo di raccogliere informazioni sulla presenza e diffusione dell'antibiotico-resistenza in ceppi batterici della famiglia delle Enterobacteriaceae isolati da feci di un ampio spettro di specie di fauna selvatica, presente in varie province della Lombardia con differenti gradi di urbanizzazione; la loro caratterizzazione fenotipica di resistenza e quella genotipica utilizzando metodiche di analisi metagenomica su pools di ceppi batterici di *Escherichia coli*.

Ahmed et al. ([2016](#))



## **2 MATERIALE E METODI (max 10 pagine)**

### **2.1 Campionamento**

Si è proceduto ad un campionamento non probabilistico di convenienza utilizzando sia i campioni raccolti durante le attività di sorveglianza del piano regionale fauna selvatica della Lombardia (cinghiali, ruminanti selvatici, lagomorfi, volatili) , sia i campioni provenienti da attività di sorveglianza del piano CWD (cervi e caprioli) e del piano West Nile Disease (Cornacchie, Gazze). I campioni di feci raccolti dall'intestino degli animali, direttamente in campo per i mammiferi abbattuti durante la stagione venatoria ( prevalentemente cinghiali), o durante la necropsia per gli animali rinvenuti morti o volatili abbattuti nell'ambito del monitoraggio WND, sono stati stoccati a temperatura di congelamento in attesa di essere processati. La raccolta dei campioni è avvenuta nel periodo compreso tra la fine del 2017 e primi mesi del 2019.

### **2.2 Esami microbiologici**

L'esame batteriologico è stato eseguito seguendo le indicazioni riportate nel metodo di prova interno IZSLER che descrive la tecnica microbiologica per la categorizzazione di isolati batterici aerobi/anaerobi facoltativi. I campioni di feci confezionati in sacchetti o barattoli o prelevati direttamente in sede necroscopica dall'intestino, sono stati disciolti in brodo di pre-aricchimento APT (acqua peptonata) e, dopo l'allestimento di tamponi, sono stati seminati su MC-Conkey Agar (terreno selettivo per enterobatteriacee) e incubati per 24-48 ore a 37°C in aerobiosi al fine di ottenere colonie isolate. Da una colonia isolata sono state realizzate colture su terreno solido Klieger Iron Agar (KIA) da utilizzare nelle successive prove di caratterizzazione (morfologica, colturale, biochimica). Il KIA costituisce un terreno differenziale impiegato principalmente come ausilio nell'identificazione di alcuni membri della famiglia delle Enterobacteriaceae. La differenziazione degli enterobatteri avviene in base alla loro capacità di fermentare il destrosio ed il lattosio e di produrre idrogeno solforato. Tutti i campioni sono stati successivamente sottoposti alla prova della citocromo ossidasi. Quelli risultanti ossidativi e fermentativi alla coltura su terreno Klieger sono stati testati per confermare fossero E.Coli (ossidasi negativo). I campioni risultati ossidasi positivi sono stati invece identificati con analisi biochimica mediante gallerie utilizzando il kit Microgen TM GnA + B-ID System.

### **2.3 Antibigrammi**

Tutti i ceppi isolati sono stati sottoposti al test di sensibilità agli antibatteri mediante la tecnica di diffusione in agar descritta nel metodo di prova interno per l'esecuzione dell'antibiogramma dell'Istituto Zooprofilattico

della Lombardia e dell'Emilia Romagna, redatto in conformità con le linee guida nazionali del Centro di Riferenza per l'Antibiotico Resistenza (CRAB) e le linee guida internazionali del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). E' stato utilizzato un panel di 7 antibiotici scelti sulla base delle Linee Guida per l'interpretazione delle prove di sensibilità ai chemioantibiotici del Centro di Riferenza Nazionale per l'Antibiotico-resistenza (link alle linee guida). Le molecole selezionate sono indicate come molecole prototipo rappresentative delle diverse classi farmacologiche:

**Ampicillina (AMP).** Molecola prototipo di Beta-lattamici tipo Amoxicillina, Etacillina. Antibiotico classificato dal WHO (Organization and others 2019) come **Critically Important Antimicrobial** e **High priority** in quanto incontra i criteri C1 e C2 dei criteri di categorizzazione e i criteri P2, e P3 dei criteri di prioritizzazione. Antibiotico a largo spettro di azione, usato in medicina umana e veterinaria sin dal 1961. L'ampicillina impedisce la formazione dei legami crociati tra le varie molecole di peptidoglicano (mureina), un componente fondamentale della parete cellulare batterica, e ne compromette la stabilità, rendendo così i batteri suscettibili allo shock osmotico. Alcuni batteri produttori dell'enzima beta-lattamasi (penicillinasi) possono inattivare l'antibiotico rendendo così il trattamento inefficace. E' uno dei pochi antibiotici attivo contro i ceppi multiresistenti di *Enterococcus faecalis* e *E.faecium*.

**Tetraciclina (TET).** Molecola prototipo di Clortetraciclina, Doxyciclina, Minociclina, Oxytetraciclina, classificato dal WHO come **Highly important** antimicrobial, in quanto incontra solo il criterio C2 di classificazione. Antibiotico a largo spettro d'azione in uso dal 1978 sia in medicina umana che veterinaria. Batteriostatico, penetra nella cellula complessata a  $Mg^{2+}$ . Lega la sub-unità 30S impedendo l'accesso degli aminoacil-tRNA al sito recettoriale A del ribosoma;I batteri di solito acquisiscono resistenza alla tetraciclina dal trasferimento orizzontale di un gene che codifica per una pompa di efflusso o una proteina di protezione ribosomiale. Le pompe Efflux espellono attivamente la tetraciclina dalla cellula, impedendo l'accumulo di una concentrazione inibente della tetraciclina nel citoplasma (Chopra and Roberts 2001). Le proteine di protezione ribosomiale interagiscono con il ribosoma e rimuovono la tetraciclina dal ribosoma, consentendo di continuare la traduzione (Connell et al. 2003).

**Ceftiofur (CFT).** Molecola prototipo di Cefalosporine a spettro esteso di 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> generazione come Cefoperazone, Cefpodoxime e Cefquinome, classificate dal WHO come **Critically Important Antimicrobial**, perchè incontrano i criteri C1, C2 e C3 e **Highest Priority** perchè soddisfano i criteri di priorità P1, P2 e P3. In particolare Le cefalosporine di 3<sup>a</sup> e più alte generazioni sono conosciute come in grado di selezionare ceppi resistenti di *Salmonella* spp e di *Escherichia coli* negli animali, e allo stesso tempo sono uno dei pochi strumenti terapeutici a disposizione per forme gravi di Salmonellosi e infezioni da *E.coli* nell'uomo e in particolare nei bambini.

**Colistina (COL).** Molecole non appartenente al panel consigliato dalla linee guida in quanto particolarmente critico per l'utilizzo in umana. E' classificata dal WHO come **Critically Important Antimicrobial** e **Highest Priority**. Le polymixine, gruppo farmacologico a cui appartiene la colistina, sono conosciute per selezionare E.coli polymixin-resistenti mediate da plasmidi. La somministrazione intravenosa di polymixina è uno dei pochi strumenti terapeutici efficaci per gravi forme di infezioni nosocomiali da E.coli e Pseudomonas aeruginosa multi-resistenti in molti paesi, soprattutto nei pazienti in condizioni critiche. E' stato inserito nel panel per verificare la presenza di resistenza a questo importante antibiotico in ceppi provenienti dalla fauna selvatica come misura del grado di contaminazione degli ambienti selvatici da parte di ceppi portatori di resistenza alle polymixine.

**Kanamicina (KAN).** Molecola prototipo degli Aminoglicosidi tra cui le streptomicine (isolate da attinomiceti del genere Streptomyces) quali Neomicina e Framicetina. Classificate dal WHO **Critically Important Antimicrobial** in quanto soddisfa i criteri C1 e C2 e **Highly important** in quanto soddisfa solo P2 e P3 tra i fattori di prioritizzazione.

**Gentamicina (GEN).** Molecola prototipo di Aminoglicosidi isolati da attinomiceti del genere Micromonospora quali Tobramicina, Apamicina, classificata come **Critically Important Antimicrobial** in quanto soddisfa i criteri C1 e C2 e **Highly important** in quanto soddisfa solo P2 e P3 tra i fattori di prioritizzazione.

**Enrofloxacin (ENR).** Molecola prototipo dei fluorochinolonici, tra cui Danofloxacin, Ciprofloxacin, Marbofloxacin, Orbifloxacin, Pradofloxacin. Antibiotici classificati da WHO come **Critically Important Antimicrobial** e **Highest Priority** in quanto soddisfano sia i criteri d'importanza C1, C2 e C3 sia i fattori di prioritizzazione P1, P2 e P3). Sono antibiotici conosciuti per selezionare negli animali ceppi di E.coli e Salmonella spp resistenti ai chinoloni che sono tra i pochi strumenti terapeutici nel caso di gravi forme di infezioni da Salmonella e E.coli.

## 2.4 Analisi metagenomiche

Le analisi metagenomiche sono state eseguite sui seguenti pools di ceppi di Escherichia coli costituiti secondo criteri di confrontabilità e rappresentatività di, area di campionamento, specie di provenienza, e in base alla disponibilità numerica; un ulteriore pool è costituito da ceppi di Klebsiella pneumoniae di particolare interesse come patogeno nosocomiale:

## 2.5 Analisi dei dati

### 2.5.1 Gestione dei dataset

I dati raccolti sono stati inseriti in foglio elettronico denominato **AMR** in formato googlesheet e quindi importato in ambiente R(R Core Team 2020) per le successive analisi. **AMR** risulta costituito da 911 righe e 23 colonne. Ogni riga corrisponde ad un isolato batterico sottoposto al test di sensibilità al panel di antibiotici identificati da una variabile univoca denominata **IDceppo**. La variabile **IDcamp** identifica in modo non univoco il campione di feci sottoposto ad analisi micorbiologica per l'isolamento e identificazione dei ceppi di *Enterobacteriacee* :

- **SPECIE** variabile categorica che riporta la specie di provenienza dei campioni di feci. Questa variabile contiene 33 livelli differenti che comporta una eccessiva parcellizzazione dei dati con presenza di poche unità per alcune specie. Si è quindi proceduto ad aggregare le specie sulla base di considerazioni tassonomiche e ecologiche in nove gruppi specie identificati dalla variabile **Specieaggreg**
- **COMUNE** variabile categorica che riporta i comuni di provenienza dei campioni di feci. Per 24 campioni di feci non era disponibile il dato relativo al Comune di provenienza.
- **Identificazione** variabile categorica che riporta il genere di appartenza dei ceppi isolati
- **AMP** (Ampicillina), **COL** (Colistina), **CFT** (Ceftiofur), **KAN** (Kanamicina), **ENR** (Enrofloxacin), **GEN** (Gentamicina), **TET** (Tetraciclina) : variabili dicotomiche che identificano la Sensibilità o Resistenza ai differenti antibiotici del panel.

Altre variabili presenti nel dataset ma non utilizzate per l'analisi dei dati sono: **FASCETTA** (identificativo, quando presente, dell'animale da cui proviene il campione di feci), **DATA\_PRELIEVO**, **DATA\_SEMINA**, **STATO\_CAMPIONE** ( se fresco o congelato), **til** ( tilmicosina), **ox** (oxacillina), **er** (eritromicina): questi tre antibiotici sono stati tutti utilizzati durante il test di sensibilità agli antibiotici, ma come da indicazione del centro di referenza per l'antibiotico-resistenza le **Enterobatteriacee** mostrano resistenza naturale, quindi i rispettivi risultati non sono stati utilizzati per le successive analisi dei dati.

Il dataset AMR ha una struttura gerarchica costituita da tre livelli: Comune, IDCamp, e IDceppo. I comuni contribuiscono con uno o più campioni di feci provenienti da diverse specie animali; da un singolo campione di feci identificato dal IDCamp, possono essere isolati da uno a più ceppi batterici appartenente alla famiglia delle enterobatteriacee identificati dal IDceppo. Le statistiche relative ai campioni di feci sono quindi state

ottenute escludendo per i campioni con più di un ceppo i record multipli con differente IDceppo ma identico IDcamp.

Le caratteristiche dei differenti comuni di provenienza dei campioni sono state ottenute da differenti database dell'ISTAT consultabili al sito (<https://www.istat.it/it/>) e quindi collegate al dataset AMR mediante il campo COMUNE, ottenendo quindi il dataset **AMR\_istat**, costituito da 876 record, utilizzato per analizzare l'associazione tre caratteristiche ambientali-sociali dei differenti comuni e la prevalenza di animali portatori di enterobatterichee resistenti ad almeno un antibiotico del panel indagato.

Le caratteristiche dei comuni utilizzate sono: **denpop(abkmq)** (densità di popolazione espressa in abitanti per Km<sup>2</sup>), **sup(kmq)** (superficie del comune in km<sup>2</sup>), **urb** (grado di urbanizzazione: variabile categorica con tre livelli: 1=densamente popolato, 2=mediamente popolato, 3=scarsamente popolato (rurale)), **hapasc** (ettari di territorio dedicati al pascolo), **capi** (numero di capi al pascolo), **aziende** (numero di aziende con animali al pascolo), **montano** (montanità del territorio), **altcentro** (altitudine in metri del comune).

## 2.5.2 Metodi statistici

**Prevalenza animali portatori di ceppi resistenti e multiresistenti.** Sulla base dei profili di resistenza dei singoli ceppi si è provveduto a classificare i ceppi in Suscettibili (ceppi sensibili a tutti gli antibiotici del panel) e Resistenti (ceppi sensibili ad almeno un antibiotico del panel) e quindi a classificare come campione di feci “Resistente”, feci portatori di almeno un ceppo resistente ad almeno un antibiotico del panel indagato. Le stime puntuali e intervallari della prevalenza complessiva e specifica per gruppo- specie dei campioni “Resistenti” sono state stimate mediante l'impiego di una distribuzione Beta a priori coniugata sulla distribuzione di  $p$  (probabilità di essere un ceppo resistente) in un esperimento binomiale ottenendo una distribuzione Beta a posteriori della probabilità  $P$ . Dal teorema di Bayes la distribuzione a posteriori di  $p$  condizionalmene ai dati osservati è data da:

$$p|x = \text{Beta}(x + \alpha, n - x + \beta)$$

dove:  $\mathbf{p}$  = probabilità di un campione di feci resistente (secondo la definizione data sopra);  $\mathbf{n}$  = numero di osservazioni;  $\mathbf{x}$  = numero di campioni resistenti;  $\alpha$  e  $\beta$  sono gli iperparametri della distribuzione a priori beta di  $p$ , che in questo caso è una Jeffrey's prior con distribuzione Beta(0.5, 0.5). Dalla distribuzione posteriore viene costruito quindi un intervallo di credibilità che raccoglie la più alta probabilità di densità di valori di  $p$  (HPD) corrispondente al 95% dei valori di  $p$  stimati. La stima puntuale della prevalenza è rappresentata dalla media della distribuzione Beta a posteriori data da:

$$mean = (x + 0.5)/(n + 1)$$

I risultati sono restituiti in forma tabellare e grafica mediante l'utilizzo del pacchetto binom (Dorai-Raj 2014) in ambiente R.

La stessa procedura è stata utilizzata per stimare la prevalenza di campioni di feci carrier di almeno un ceppo risultato multi-resistente (MR), dove per multi-resistenti si definiscono i ceppi resistenti a tre o più antibiotici del panel.

### **Variabilità della Prevalenza di animali portatori di ceppi resistenti e caratteristiche ambientali**

Esistono evidenze in letteratura che la presenza (prevalenza/occorrenza ) di animali selvatici portatori di ceppi AR è da attribuire alla contaminazione ambientale e/o all'interazione tra specie doemstiche e selvatiche. Per 648 campioni è risultato disponibile il dato geografico e la caratterizzazione territoriale ISTAT. Su questi campioni è stato quindi possibile valutare la relazione tra prevalenza di capi selvatici portatori di ceppi R (e di ceppi MR) e i caratteri territoriali di provenienza dei campioni. Per questo tipo di valutazione sono stati esclusi i dati riferiti ai gruppi-specie meno numerosi: LEPRE, UCCELLI ACQUATICI e ALTRI VOLATILI. Dopo esclusione di questi gruppi specie, il dataset comprende informazioni su 603 campioni. I dati Istat disponibili, utilizzati, per esplorare l'associazione tra prevalenza di capi portatori di AR e indicatori di "contaminazione" derivati dai singoli comuni sono: densità di popolazione ( da cui deriva la classificazione del grado di urbanizzazione dell'ISTAT), superficie kmq del comune, altitudine , superfice a pascolo, numero di capi domestici al pascolo , n.aziende al pascolo. Per questo studio è stato adattato un modello bayesiano multilevel specificato a priori mediante un Direct Acyclic Graph (DAG) che ha permesso di chiarire la dipendenza delle variabili e scegliere quelle da inserire nel modello (Fig2). Formalmente il modello è il seguente:

$$R_i \sim Bernoulli(p)$$

$$logit(p) = \alpha_{Comune} + \beta * X$$

$$\alpha_{Comune} \sim Normal(\alpha, \sigma)$$

$$\alpha \sim Normal(0, 1)$$

$$\sigma \sim HalfCauchy(0,1)$$

$$\beta \sim Normal(0, 1)$$

Dove  $X$  rappresenta la matrice dei predittori e  $\alpha_{\text{Comune}}$  definisce la variabile con intercetta variabile. Tutte le variabili quantitative predittorie (Urbanizzazione e Pascolo) sono state standardizzate in accordo a quanto suggerisce (Gelman, Hill, and Vehtari 2020), sia per una maggior interpretabilità dei coefficienti sia per una migliore performance del motore HCMCM che per una miglior utilizzo delle prior del modello. Le stime dei parametri del modello sono state ottenute mediante campionamento con l'algoritmo Hamiltonian Monte Carlo utilizzando quattro catene, con 4000 iterazioni di cui 1000 di warmup ( escluse dopo il campionamento). Per questo modello è stato utilizzato il pacchetto brms (Bürkner 2018) come interfaccia del linguaggio STAN (Gelman, Lee, and Guo 2015) implementato in R nel pacchetto rstan (Stan Development Team 2020). Si è proceduto ad adattare i seguenti modelli utilizzando i diversi predittori esplorando termini d'interazione ragionevoli dal punto di vista epidemiologico:

- modello 1 :  $\text{logit}(p) = \alpha_{\text{Comune}} + \beta_{\text{Specie}} + \beta_{\text{Pascolo}} + \beta_{\text{Urbanizzazione}}$
- modello 2 :  $\text{logit}(p) = \alpha_{\text{Comune}} + \beta_{\text{Specie}} + \beta_{\text{Pascolo}} + \beta_{\text{Urbanizzazione}} + \beta_{\text{Specie}*\text{Pascolo}}$
- modello 3 :  $\text{logit}(p) = \alpha_{\text{Comune}} + \beta_{\text{Specie}} + \beta_{\text{Pascolo}} + \beta_{\text{Urbanizzazione}} + \beta_{\text{Specie}*\text{Pascolo}} + \beta_{\text{Specie}*\text{Urbanizzazione}}$

Il confronto tra i diversi modelli è stato effettuato mediante l'utilizzo delle tecniche di cross-validazione K-fold cross-validation con  $K=10$  subset di dati (Gelman, Hill, and Vehtari 2020).

**Prevalenza di ceppi resistenti e profili fenotipici di resistenza ai differenti antibiotici.** Sulla base dei profili di resistenza dei singoli ceppi si è provveduto a classificare i ceppi in

- Suscettibili (ceppi sensibili a tutti gli antibiotici del panel)
- Resistenti (ceppi sensibili fino a 2 antibiotici del panel)
- Multiresistenti (ceppi sensibili a 3 o più antibiotici del panel).

La stima della distribuzione a posteriori della prevalenza di ceppi delle diverse classi è stata ottenuta mediante adattamento di un modello bayesiano analogo a quello utilizzato per la stima della prevalenza di animali portatori di ceppi resistenti a cui si rimanda per i dettagli.

Per ogni singolo antibiotico è stata stimata la distribuzione a posteriori della prevalenza di ceppi resistenti complessivamente e nelle differenti specie di provenienza dei campioni, adattando modelli bayesiani analogo al precedente a cui si rimanda.

Le distribuzioni a posteriori delle prevalenze sono state quindi riassunte mediante il calcolo della mediana e dei percentili 2.5 e 97.5, definendo quindi un intervallo di credibilità bayesiano del 95%.

**Biodiversità dei profili fenotipici di resistenza** Sulla base delle resistenze ai differenti antibiotici del panel i ceppi sono stati caratterizzati per il loro profilo di resistenza indicato da una stringa costituita dall'abbreviazione di tre lettere degli antibiotici resistenti. Ad esempio la stringa AMP-TET-COL indica un ceppo batterico con fenotipo di resistenza a Ampicillina, Tetraciclina, e Colistina. I differenti ceppi sono stati quindi aggregati per fenotipo e per gruppo-specie di provenienza dei ceppi e analizzati mediante metodi di analisi della biodiversità calcolando quattro misure di diversità legate alle misure di entropia generalizzata di Rényi secondo l'approccio descritto da (Mather et al. 2012). L'entropia di Rényi si calcola mediante la seguente formula:

$$H_\alpha = \frac{Ln \sum p^\alpha}{1 - \alpha}$$

$\alpha$  rappresenta un parametro di scala, lungo il quale la ricchezza del profilo e l'abbondanza relativa dei profili sono pesate in modo differente, all'aumentare di  $\alpha$  il peso dei profili più rari è maggiormente ridimensionato nel calcolo della diversità. Alcuni comuni indici di diversità sono relazionati all'entropia di Rényi, ad esempio quando  $\alpha = 1$  si ottiene l'indice di Shannon(H). Queste relazioni sono più evidenti quando si utilizza il cosiddetto numero di Hill che è associato all'entropia  $H_\alpha$  di Renyi da:  $H_\alpha - Hill = exp(H_\alpha)$ . I quattro indici di diversità che sono stati confrontati tra i comparti rappresentati dai gruppi-specie si trovano a diversi livelli di  $\alpha$ : con  $\alpha = 0$  si ha l'equivalente della Richness che rappresenta una semplice conta dei differenti profili di resistenza e ignora la relativa abbondanza e quindi considera profili rari e comuni allo stesso modo; quando  $\alpha = 1$  si ha l'equivalente dell'esponente dell'indice di Shannon che rappresenta la probabilità che due ceppi estratti a caso hanno lo stesso profilo di resistenza; quando  $\alpha = 2$  si ha l'equivalente dell'inverso dell'indice S di Simpson che rappresenta l'abbondanza relativa di ogni profilo e infine con  $\alpha = \infty$  si ha l'equivalente dell'inverso dell'indice di dominanza di Berger\_Parker che rappresenta la proporzione dei profili più comuni nel campione. Usando l'entropia di Rényi è possibile costruire un grafico dei profili di diversità che sono più informativi di quanto non si ottenga usando i singoli indici di diversità. Curve piatte indicano che le comunità di fenotipi hanno un alto grado di uniformità con assenza di fenotipi dominanti. In caso di curve che declinano rapidamente con lunghe code, indicano comunità di fenotipi in cui sono presenti molti fenotipi rari e quindi presenza di uno o pochi fenotipi dominanti. Il confronto tra curve per siti differenti o come in questo studio per gruppo-specie differente avviene non solo attraverso la differente forma ma anche attraverso la posizione relativa rispetto all'asse y. Affinchè vengano considerati completamente differenti due comunità sulla base della diversità le curve non devono sovrapporsi. A questo riguardo può essere utile confrontare la forma delle curve partendo da un punto in comune fisso per tutte le comunità. Al valore di  $\alpha = 0$  l'entropia di Renyi è interpretabile come indice di richness. Se si sottrae il valore di entropia ad  $\alpha = 0$  da tutti i valori di entropia misurati ai diversi valori di  $\alpha$  si ottiene un grafico in cui tutte le curve partono



da un punto in comune corrispondete appunto a  $\alpha = 0$ . In questo modo si ottiene una standardizzazione o normalizzazione delle curve con il focus di valutazione solo sulla forma delle curve stesse. In questo studio si è proceduto quindi a stimare l'entropia di Renyi e quindi a visualizzare i risultati delle curve normalizzate di diversità delle comunità di fenotipi di resistenza dei diversi gruppi-specie, utilizzando le funzioni del pacchetto BiodiversityR, come indicato da (Kindt and Coe [2005](#))

## 3 RISULTATI

### 3.1 QUADRO GENERALE

#### 3.1.1 Territorio

L'attività di campionamento si è svolta tra Settembre 2017 e Dicembre 2019 in sette province della Lombardia : Bergamo, Pavia, Varese, Como, Lecco e Brescia da un totale di 223 comuni (Fig3). Sulla base dei criteri di classificazione dei comuni adottati dall'ISTAT, in merito a grado di urbanizzazione, e montanità risulta che : 415 campioni (57%) provengono da comuni a bassa urbanizzazione (aree rurali scarsamente popolate), 221 campioni (30%) da comuni a densità intermedia di popolazione e 11 campioni (1.15%) da comuni ad alta densità di popolazione; 472 campioni (65%) provengono da comuni totalmente montani, 161 (22%) da comuni in pianura e 14 campioni (2%), da aree parzialmente montane (collinari). Questi risultati sono riferiti ad un totale di 647 campioni provenienti da comuni per i quali era disponibile il dato ISTAT di urbanizzazione e montanità. In tabella 1 sono riportate le statistiche descrittive della caratterizzazione geografica e di popolazione dei comuni da cui provengono i campioni.

#### 3.1.2 Fauna selvatica (controllare le %)

Sono stati raccolti complessivamente 670 campioni di feci da 33 differenti specie di fauna selvatica. Le specie più frequentemente campionate sono il Capriolo (*Capreolus capreolus*) con 191 campioni ( 28.5%), la Cornacchia grigia (*Corvus cornix*) con 122 (18.2%), il Cervo (*Cervus elaphus*) , con 80 campioni (11.9%), il Cinghiale (*Sus scrofa*) con 76 campioni (11.3%), il Camoscio (*Rupicapra rupicapra*) 46 campioni (6.9%) e il Muflone (*Ovis aries musimon*) 43 campioni (6.4%) che rappresentano complessivamente più dell'80% dei campioni esaminati. Il restante 20% è distribuito su un totale di 27 specie differenti descritte in tabella 2.

Oltre il 90% di campioni dei gruppi-specie CERVIDI, BOVIDI e SUIDI proviene da territori classificati da ISTAT come Totalmente Montani; il 75% dei campioni del gruppo CARNIVORI proviene da territori Totalmente Montani; l'86% dei campioni del gruppo CORVIDI proviene da territori Non Montani e il 50% dei campioni del gruppo RAPACI proviene da territori Totalmente Montani e il 50% da territori Non Montani. Per tutti i gruppi specie risulta poco rappresentata la categoria territoriale Parzialmente Montano (P) (tabella 3). ISTAT sulla base della densità di popolazione per Km<sup>2</sup> classifica i comuni in 3 classi di urbanizzazione: 1=densamente popolato, 2=mediamente popolato, 3=scarsamente popolato (rurale). La distribuzione dei campioni dei diversi gruppi specie rispetto alle caratteristiche di urbanizzazione dei comuni di provenienza riflette quanto già visto per la montanità dei territori campionati, con una più alta frequenza

di campioni provenienti da territori rurali e a densità media che da comuni ad elevata densità di popolazione. In particolare dai territori a bassa urbanizzazione (rurali) proviene il 72% dei campioni del gruppo CERVIDI, il 75% dei campioni del gruppo BOVIDI, il 67% dei campioni del gruppo SUIDI, il 70% dei campioni del gruppo CARNIVORI, il 57% dei campioni dal gruppo CORVIDI e il 30% dal gruppo RAPACI (tabella 4)

### 3.1.3 Esami microbiologici

Dai 671 campioni di feci analizzati sono stati isolati 911 ceppi batterici identificati come appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriacee. *Escherichia coli* (E.coli) rappresenta il 67.6% dei ceppi isolati, il restante 32% dei ceppi è distribuito su un totale di 14 generi differenti ( tabella 5). Per 67 ceppi non si è giunti all'identificazione basata sulle prove biochimiche di genere. Per questi ceppi non si è proceduto ad ulteriore approfondimenti diagnostici ma sono stati comunque archiviati in brodo con glicerolo e quindi congelati.

### 3.1.4 Antibigrammi

Sono stati eseguiti 910 antibiogrammi. Complessivamente 392 ceppi (43%) sono risultati Suscettibili (S) al panel di antibiotici testati ; 423 (46%) i ceppi Resistenti (R) fino ad un massimo di 2 antibiotici e infine 95 (10%) ceppi sono risultati Multiresistenti (MR), con resistenza a 3 o più antibiotici. La distribuzione del numero di resistenze al panel di antibiotici per isolato (Antibiogram length) è sintetizzata in figura 4

## 3.2 PREVALENZA, TRA LA FAUNA SELVATICA, DI ANIMALI PORTATORI DI CEPPI ANTIBIOTICO-RESISTENTI

Complessivamente da 670 campioni di feci di fauna selvatica da cui è stato isolato almeno un ceppo di *Enterobacteriacee* e su cui è stato eseguito l'antibiogramma, in 421 è stato isolato almeno un ceppo resistente ad uno o più antibiotici del panel indagato, pari ad una Prevalenza complessiva (Overall Prevalence) del 62% (95% HPD: 58-67%).

La variabilità tra i gruppi specie è particolarmente ampia: nei CORVIDI si osserva la prevalenza più elevata (84%), mentre nei BOVIDI la più bassa (37%). A causa della bassa numerosità campionaria si osservano stime con incertezza molto ampia nei gruppi : LEPRE, ALTRI VOLATILI, UCCELLI ACQUATICI, CARNIVORI e RAPACI. In figura 5 è riportata per ogni gruppo specie la distribuzione a posteriori della prevalenza di animali carrier di ceppi antibiotico-resistenti e in tabella (6) le stime puntuali e i valori dell'intervallo di massima densità delle stime (95% High Probability Density HPD ).

Su 670 campioni di feci, 92 presentano almeno un ceppo MULTI-RESISTENTE (numero di resistenze  $\geq$  a 3), pari ad una prevalenza del 14% (95% HPD:11%-16%). La variabilità tra gruppi specie risulta molto ampia: la prevalenza di animali selvatici portatori di ceppi multiresistenti varia da un minimo del 4% nel gruppo UCCELLI ACQUATICI ad un massimo dell'88% nella LEPRE. La bassa numerosità dei campioni di alcuni gruppi specie rende le stime molto incerte. In figura 6 è riportata per ogni gruppo specie la distribuzione a posteriori della prevalenza di animali carrier di ceppi multi-resistenti e in tabella (7) le stime puntuali e i valori dell'intervallo di massima densità delle stime (95% High Probability Density HPD ).

### 3.2.1 Associazione tra la prevalenza di animali carrier e caratteristiche ambientali

Il confronto tra modelli ha permesso di selezionare il modello 2 con le migliori performance in termini di predittività rispetto agli altri due modelli come indicato dai risultati della K-fold cross-validation riportati in tabella 8. Le stime dei coefficienti di regressione e gli intervalli di credibilità sono riassunti in tabella e le rispettive distribuzioni a posteriori rappresentate nel grafico

Secondo il modello, la probabilità di un animale di essere un carrier di ceppi di *Enterobacteriaceae* antibiotico resistenti aumenta all'aumentare della superficie dedicata al pascolo dei comuni in misura differente a seconda del gruppo-specie di appartenenza (interazione tra specie e pascolo) e in misura ridotta anche dall'aumentare della densità di popolazione per kmq come misura del grado di urbanizzazione dei comuni.

Il modello adattato indica che la probabilità che un animale sia portatore di almeno un ceppo di Enterobacteriaceae resistente ad almeno un antibiotico del panel indagato aumenta all'aumentare della dimensione dell'area adibita a pascolo condizionalmente al gruppo specie di appartenenza (interazione tra i predittori gruppo-specie e pascolo) e all'aumentare del grado di urbanizzazione (misurato in densità di popolazione per kmq) dei comuni aumenta la probabilità di animali carrier di ceppi resistenti. In tabella x sono riportate le stime a posteriori dei coefficienti di regressione e i rispettivi intervalli di credibilità.

## 3.3 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA DEGLI ISOLATI BATTERICI

La maggior parte dei ceppi (oltre l'80%) ha mostrato resistenza nei confronti di AMP (392 ceppi 42.47%) e TET (342 ceppi 37.05%) in cui si osserva una ampia variabilità nei differenti gruppi di Specie (Fig4).

In particolare, escludendo i ceppi derivati da gruppi specie con ridotta dimensione del campione, la maggior frequenza di ceppi resistenti a AMP si osserva negli isolati del gruppo CORVIDI (58%), del gruppo CERVIDI

(45%) e RAPACI (42%); le frequenze minori si osservano nel gruppo BOVIDI (26%) e SUIDI (22%). Le resistenze alle tetracicline sono risultate più frequenti nei ceppi isolati dai CORVIDI (51%) e RAPACI (48%), mentre le più basse in isolati da SUIDI (34%), CERVIDI(32%), BOVIDI(20%).

Nei confronti della COLISTINA, antibiotico di particolare interesse in ambito clinico umano, classificato come. . . . si osserva una bassa frequenza di ceppi resistenti da un minimo dello 0.5% osservato nei ceppi isolati dai SUIDI, ad un massimo del 16% osservato sia nei RAPACI che nella LEPRE. Anche per il CEFTIOFUR, cefalosporina di 3 generazione nei confronti dei quali si è diffusa a livello mondiale la selezione di ceppi ESBL. . . si osserva una bassa prevalenza di ceppi resistenti: minimo 2.1% negli UCCELLI ACQUATICI, massimo 24% nei RAPACI. La GEN risulta l'antibiotico verso cui gli isolati si sono mostrati in modo uniforme tra le differenti specie meno resistenti (12 ceppi 1.30%). Anche per ENR e KAN si osserva una bassa e uniforme prevalenza di ceppi resistenti tra i diversi gruppi specie. (tabella 4)

Il profilo di resistenza tra i differenti generi di ceppi isolati conferma che AMP e TET sono gli antibiotici verso i quali la maggior parte degli isolati mostra la maggior frequenza di resistenze (tabella 5).

Si osservano 39 differenti profili di co-resistenza (da 1 a più AB) (fig.6). I profili più frequenti risultano: TET-AMP (141 ceppi), AMP (130 ceppi), TET (85 ceppi), CFT-TET-AMP (27 ceppi), COL-TET-AMP (14 ceppi), COL-TET (12 ceppi) e CFT-TET (12 ceppi), che rappresentano più dell'80% dei ceppi. Il restante 20% è distribuito nei restanti 32 profili.

Diversità ecologica dei differenti profili di antibiotico-resistenza La figura 6 illustra la distribuzione dei ceppi in base al profilo di co-resistenza e la specie di fauna selvatica da cui provengono. Si può osservare la "rarità" di molti profili presenti solo in determinati gruppi Specie. Complessivamente si osserva una scarsa uniformità di profili tra i gruppi specie, con una particolare ricchezza di differenti profili nel gruppo CERVIDI e CORVIDI che sono i più rappresentati ma anche nei ceppi isolati dai RAPACI sebbene in numero sensibilmente più ridotto rispetto ai precedenti.

Gli indici di diversità (tab.6)sono riassunti in un grafico di Renyi entropy standardizzato (fig.7). Nella popolazione di CERVIDI si osserva un profilo di dominanza in termini di diversità con una minore diversità di profili di co-resistenza con una forte dominanza di pochi profili. AL contrario i gruppi specie BOVIDI, SUIDI, CARNIVORI, LEPRE, UCCELLI ACQUATICI e ALRI VOLATILI, mostrano un profilo di uniformità (evenness), quindi caratterizzato da maggiore diversità senza la presenza di profili di co-resistenza relativamente dominanti. Le popolazione di CORVIDI e RAPACI mostrano un sovrapponibile profilo di diversità intermedio rispetto a quello di dominanza dei CERVIDI e di evenness degli altri gruppi-specie.

Caratterizzazione genomica dei ceppi ceftiofur-resistenti La resistenza dei ceppi isolati al Cefotiofur è risultata poco frequente (prev. . . .)

### **3.4 POOL METAGENOMICI**

#### **4   DISCUSSIONE E CONCLUSIONI (max 10 pagine)**

## **5 Raccomandazioni (max 2 pagine)**

**5.0.1** elementi gestionali e/o diagnostici

**5.0.2** indicazioni per la ricerca

**5.0.3** sugg per eventuali provvedimenti normativi

## **6 MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI (1 pagina)**



## ELENCO FIGURE

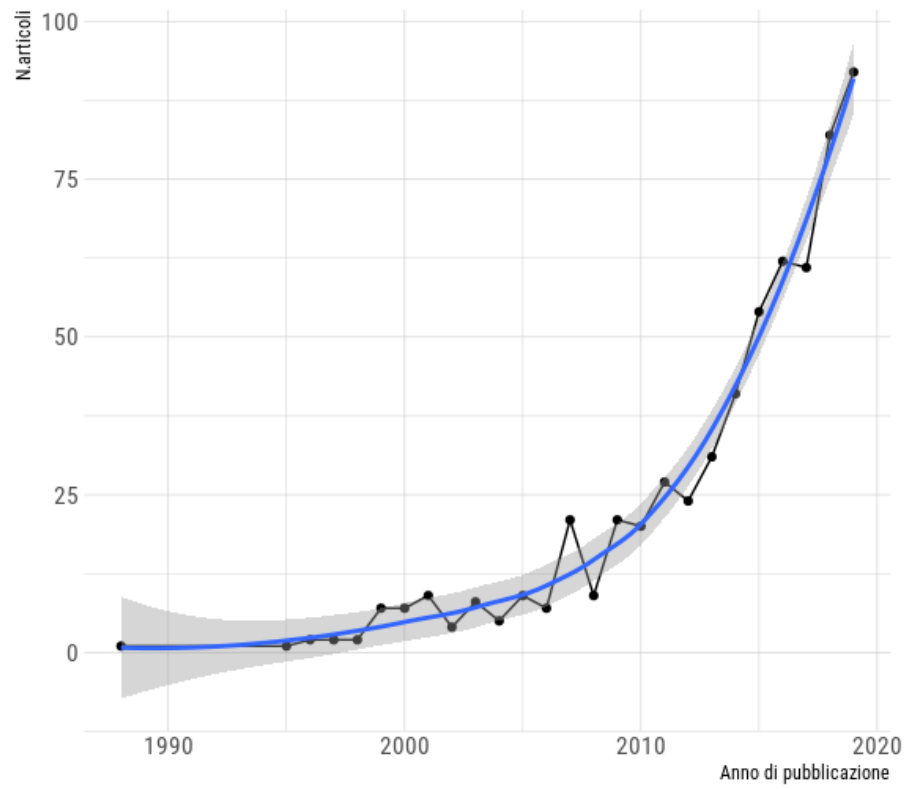


Figura 1: Andamento annuale del numero di pubblicazioni relative all'AMR nella fauna selvatica.

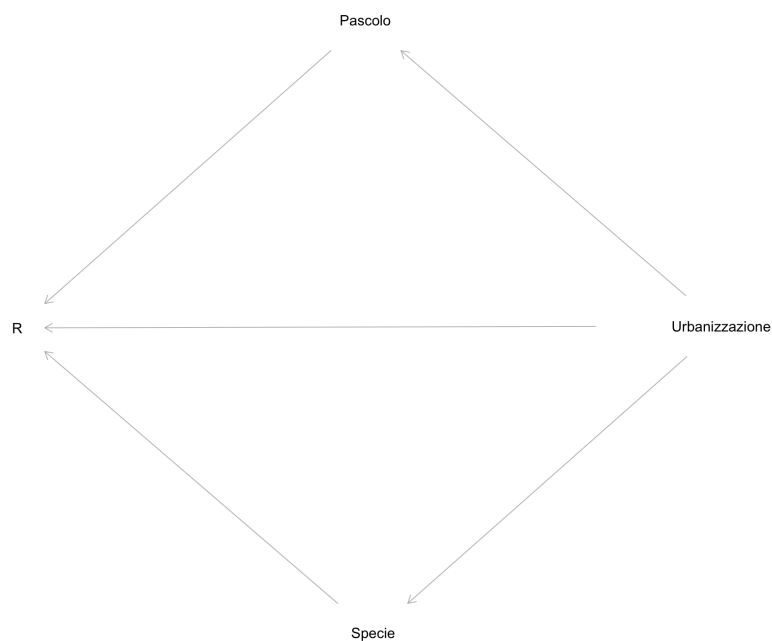


Figura 2: DAG-Direct Acyclic Graph: secondo il modello qui specificato, la probabilità di Resistenza è dipendente dalla Specie di provenienza dei campioni, dalla superficie del comune dedicata al Pascolo e dal grado di Urbanizzazione. Sia la Specie che frequenta un determinato comune che il Pascolo sono dipendenze dal grado di Urbanizzazione. Specie e Pascolo sono indipendenti condizionalmente al grado di Urbanizzazione.

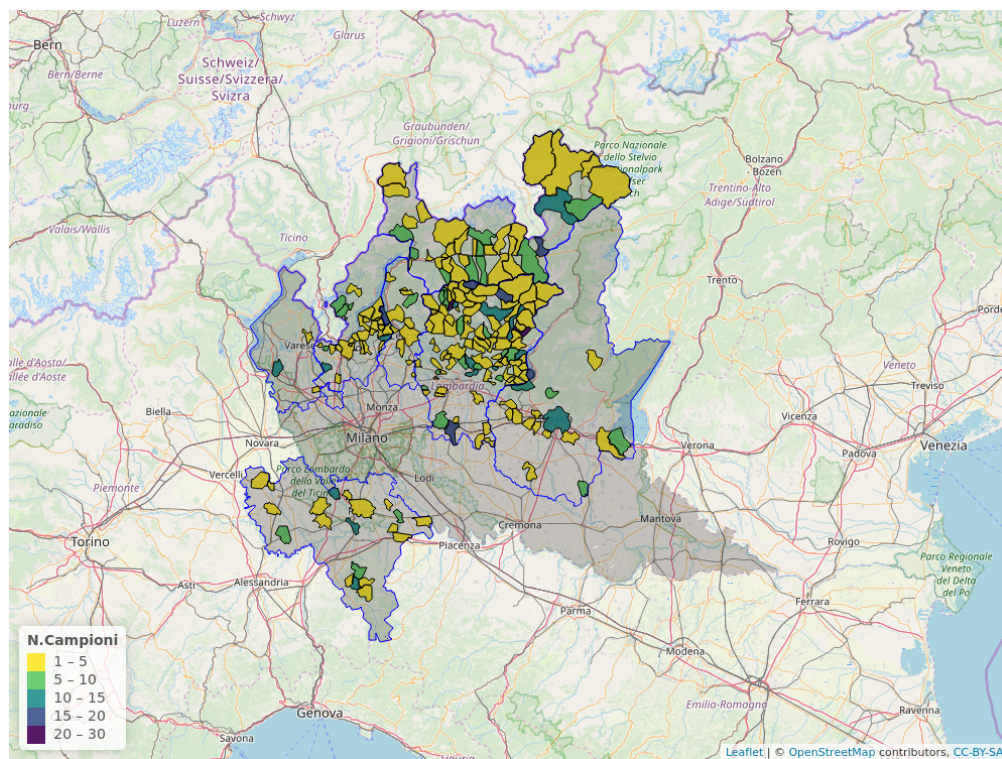


Figura 3: Comuni di provenienza dei campioni

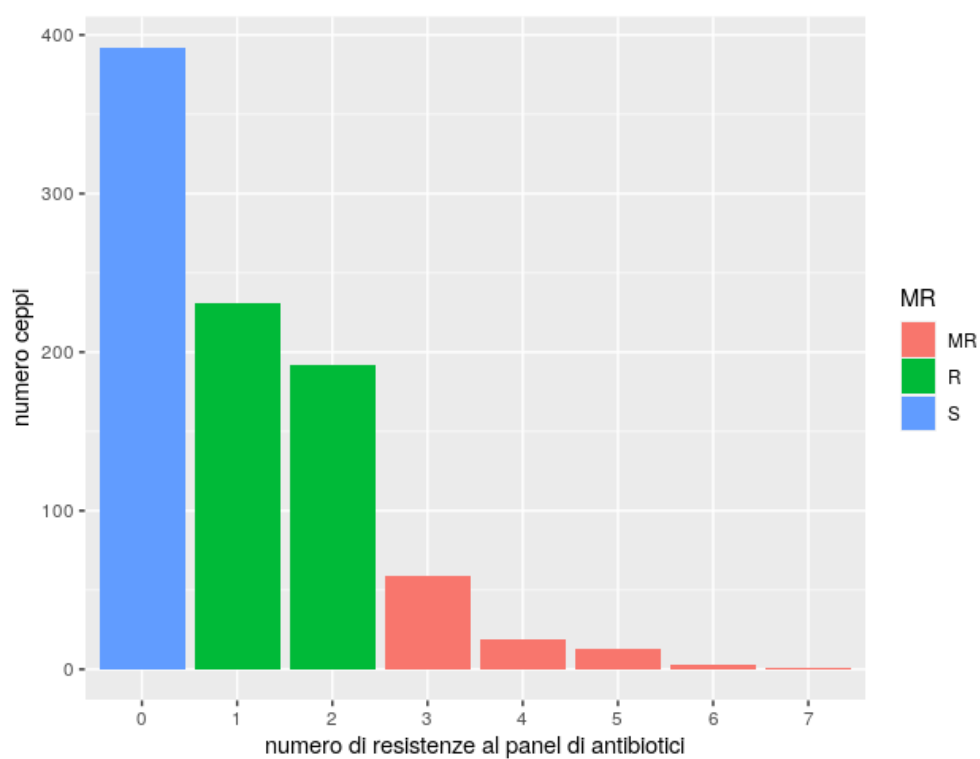


Figura 4: distribuzione numero di resistenze al panel di antibiotici

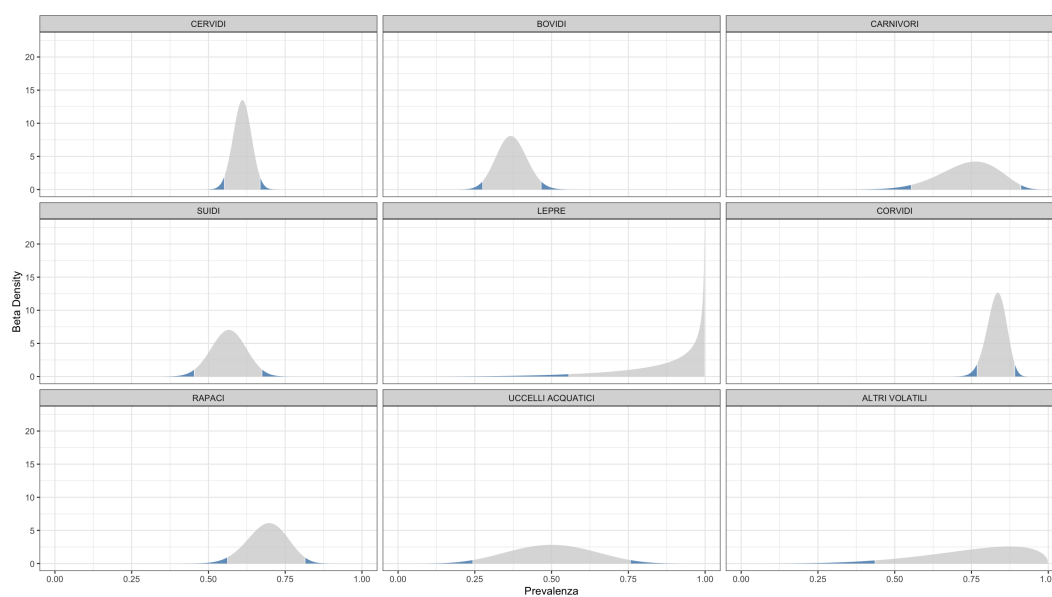


Figura 5: Distribuzione a posteriori delle stime di prevalenza di animali carrier di ceppi antibiotico-resistenti nei diversi gruppi-specie

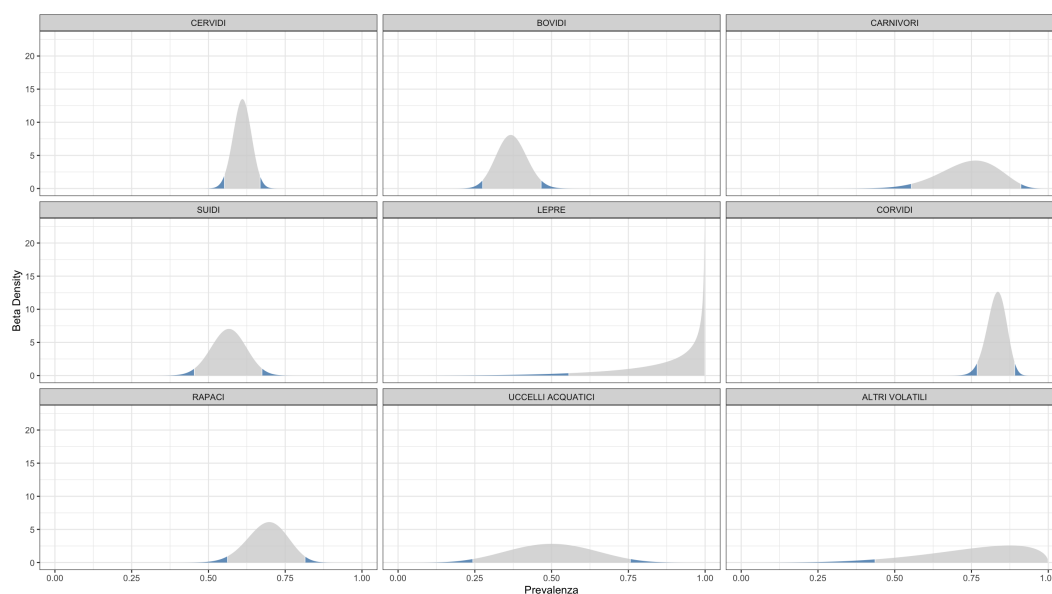


Figura 6: Distribuzione a posteriori delle stime di prevalenza di animali carrier di ceppi multi-resistenti nei diversi gruppi-specie

## ELENCO TABELLE

Tabella 1: Caratterizzazione dei comuni di provenienza dei campioni

Parametri	min	q25	median	q75	max	mean	sd
Superficie (Kmq)	1.97	10.6	17.1	29.2	227	29.8	43.9
Densità di popolazione (Ab/Kmq)	4.02	45.1	128.1	257.1	2210	250.7	357.3
Altitudine mediana	48.00	185.0	600.0	1120.0	2650	773.3	684.6
Superficie al pascolo (ettari)	0.09	11.0	60.0	170.9	2630	178.8	338.8
Aziende con pascolo	1.00	3.0	8.0	16.0	425	12.6	20.3
Capi al pascolo	2.00	52.0	133.0	293.0	8429	307.1	602.7

Tabella 2: Distribuzione del numero di campioni di feci in base alle differenti specie di fauna selvatica di origine, raggruppati per il gruppo-specie di appartenenza

Gruppo	SPECIE	n	prop
CERVIDI	CAPRIOLO	191	28.51
CERVIDI	CERVO	80	11.94
CERVIDI	DAINO	1	0.15
BOVIDI	CAMOSCIO	46	6.87
BOVIDI	MUFLONE	43	6.42
BOVIDI	STAMBECCO	6	0.90
CARNIVORI	TASSO	4	0.60
CARNIVORI	VOLPE	16	2.39
SUIDI	CINGHIALE	76	11.34
LEPRE	LEPRE	3	0.45
CORVIDI	CORNACCHIA	122	18.21
CORVIDI	GAZZA	12	1.79
CORVIDI	GHIANDAIA	4	0.60
RAPACI	ALLOCCO	3	0.45
RAPACI	ASSIOLO	2	0.30
RAPACI	CIVETTA	10	1.49
RAPACI	CIVETTA NANA	1	0.15
RAPACI	FALCO PECCHIAIOLO	5	0.75
RAPACI	GHEPPIO	9	1.34
RAPACI	GUFO REALE	4	0.60
RAPACI	NIBBIO BRUNO	1	0.15
RAPACI	POIANA	3	0.45
RAPACI	SPARVIERO	11	1.64
UCCELLI ACQUATICI	CIGNO REALE	3	0.45
UCCELLI ACQUATICI	CORMORANO	1	0.15
UCCELLI ACQUATICI	FENICOTTERO	1	0.15
UCCELLI ACQUATICI	GABBIANO	1	0.15
UCCELLI ACQUATICI	GABBIANO REALE	1	0.15
UCCELLI ACQUATICI	GERMANO REALE	5	0.75
ALTRI VOLATILI	FAGIANO	3	0.45
ALTRI VOLATILI	PICCIONE	1	0.15
ALTRI VOLATILI	STARNA	1	0.15
Totale		679	100.00

Tabella 3: Distribuzione del numero di campioni di feci in base alle caratteristiche territoriali di provenienza per i differenti gruppo-specie di appartenenza (NM= Non Montani, P= Parzialmente Montani, T= Totalmente Montani)

Specieagg	NM	P	T	Total
CERVIDI	3	5	248	256
BOVIDI	0	4	88	92
CARNIVORI	5	0	15	20
SUIDI	3	1	68	72
LEPRE	1	0	2	3
CORVIDI	118	1	19	138
RAPACI	24	0	25	49
UCCELLI ACQUATICI	3	3	6	12
ALTRI VOLATILI	4	0	1	5

Tabella 4: Distribuzione del numero di campioni di feci in base al grado di urbanizzazione dei comuni di provenienza per i differenti gruppo-specie di appartenenza (UA= Urbanizzazione ALta, UM= Urbanizzazione Media, UB= Urbanizzazione Bassa)

Gruppo Specie	UA	UM	UB
CERVIDI	1	70	185
BOVIDI	4	19	69
CARNIVORI	0	6	14
SUIDI	0	24	48
LEPRE	0	1	2
CORVIDI	1	58	79
RAPACI	1	33	15
UCCELLI ACQUATICI	3	6	3
ALTRI VOLATILI	1	4	0

Tabella 5: Distribuzione del numero e proporzione di ceppi della famiglia Enterobacteriaceae suddivise per genere, isolati dai 671 campioni di feci analizzati)

identificazione	n	prop(%)
E.coli	615	67.58
Klebsiella	61	6.70
Enterobacter	56	6.15
Serratia	40	4.40
Pantoea	39	4.29
Hafnia	36	3.96
Proteus	14	1.54
Acinetobacter	13	1.43
Citrobacter	12	1.32
Yersinia	7	0.77
Cronobacter	6	0.66
Salmonella	5	0.55
Providencia	4	0.44
Pseudomonas	1	0.11
Shigella	1	0.11
Total	910	100.00

Tabella 6: Stime della prevalenza di campioni resistenti suddivisi per gruppo-specie: R= numero di campioni resistenti, N= numero campioni esaminati, Prevalenza = media della distribuzione beta, inf-HPD= valore inferiore dell'intervallo HPD, sup-HPD = valore superiore dell'intervallo HPD)

Specieagg	R	N	Prevalenza	inf HPD	sup HPD
LEPRE	3	3	0.88	0.56	1.00
CORVIDI	115	138	0.83	0.77	0.89
ALTRI VOLATILI	4	5	0.75	0.44	1.00
CARNIVORI	15	20	0.74	0.55	0.91
RAPACI	34	49	0.69	0.56	0.81
CERVIDI	166	272	0.61	0.55	0.67
SUIDI	43	76	0.56	0.45	0.67
UCCELLI ACQUATICI	6	12	0.50	0.24	0.76
BOVIDI	35	95	0.37	0.27	0.47

Tabella 7: Stime della prevalenza di campioni multi-resistenti suddivisi per gruppo-specie: MR= numero di campioni resistenti, N= numero campioni esaminati, Prevalenza = media della distribuzione beta, inf-HPD= valore inferiore dell'intervallo HPD, sup-HPD = valore superiore dell'intervallo HPD)

Specieagg	MR	N	Prevalenza	inf HPD	sup HPD
LEPRE	1	3	0.38	0.01	0.77
RAPACI	15	49	0.31	0.19	0.44
CORVIDI	29	138	0.21	0.15	0.28
CARNIVORI	3	20	0.17	0.03	0.32
CERVIDI	32	272	0.12	0.08	0.16
SUIDI	7	76	0.10	0.04	0.16
ALTRI VOLATILI	0	5	0.08	0.00	0.31
BOVIDI	5	95	0.06	0.02	0.10
UCCELLI ACQUATICI	0	12	0.04	0.00	0.15



Tabella 8: Confronto tra modelli mediante K-fold cross-validation

	elpd_diff	se_diff	elpd_kfold	se_elpd_kfold	p_kfold	se_p_kfold
mod2	0.0	0.0	-346	13	NA	NA
mod1	-3.1	4.9	-350	12	NA	NA
mod3	-14.8	4.3	-361	14	NA	NA

## Bibliografia

- Ahmed, Marwa Fawzy El Metwaly, Hosny El-Adawy, Helmut Hotzel, Herbert Tomaso, Heinrich Neubauer, Nicole Kemper, Joerg Hartung, and Hafez Mohamed Hafez. 2016. “Prevalence, Genotyping and Risk Factors of Thermophilic *Campylobacter* Spreading in Organic Turkey Farms in Germany.” *GUT PATHOGENS* 8 (June). <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0108-2>.
- Allen, Heather K, Justin Donato, Helena Huimi Wang, Karen A Cloud-Hansen, Julian Davies, and Jo Handelsman. 2010. “Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments.” *Nature Reviews Microbiology* 8 (4): 251–59.
- Andersson, Dan I, and Diarmaid Hughes. 2010. “Antibiotic Resistance and Its Cost: Is It Possible to Reverse Resistance?” *Nature Reviews Microbiology* 8 (4): 260–71.
- Angulo, FJ, VN Nargund, and TC Chiller. 2004. “Evidence of an Association Between Use of Anti-Microbial Agents in Food Animals and Anti-Microbial Resistance Among Bacteria Isolated from Humans and the Human Health Consequences of Such Resistance.” *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 51 (8-9): 374–79.
- Baker-Austin, Craig, Meredith S Wright, Ramunas Stepanauskas, and JV McArthur. 2006. “Co-Selection of Antibiotic and Metal Resistance.” *Trends in Microbiology* 14 (4): 176–82.
- Bonardi, Silvia, Clotilde Silvia Cabassi, Simona Longhi, Federico Pia, Margherita Corradi, Stefano Gilioli, and Erika Scaltriti. 2018. “Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia Coli* from Mesenteric Lymph Nodes of Wild Boars (*Sus Scrofa*).” *ITALIAN JOURNAL OF FOOD SAFETY* 7 (4): 213–16. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.7707>.
- Bürkner, Paul-Christian. 2018. “Advanced Bayesian Multilevel Modeling with the R Package brms.” *The R Journal* 10 (1): 395–411. <https://doi.org/10.32614/RJ-2018-017>.
- Camarda, Antonio, Elena Circella, Donato Pennelli, Anna Madio, Giordano Bruni, Vito Lagrasta, Giacomo Marzano, Egidio Mallia, and Evelyn Campagnari. 2006. “Wild Birds as Biological Indicators of Environmental Pollution: Biotyping and Antimicrobial Resistance Patterns of *Escherichia Coli* Isolated from Audouin’s Gulls (*Larus Audouinii*) Living in the Bay of Gallipoli (Italy).” *ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE* 5 (3): 287–90.
- Caprioli, A, G Donelli, V Falbo, C Passi, A Pagano, and A Mantovani. 1991. “Antimicrobial Resistance and Production of Toxins in *Escherichia Coli* Strains from Wild Ruminants and the Alpine Marmot.” *Journal of Wildlife Diseases* 27 (2): 324–27.

- Carattoli, Alessandra. 2013. "Plasmids and the Spread of Resistance." *International Journal of Medical Microbiology* 303 (6-7): 298–304.
- Chopra, Ian, and Marilyn Roberts. 2001. "Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (2): 232–60.
- Connell, Sean R, Dobryan M Tracz, Knud H Nierhaus, and Diane E Taylor. 2003. "Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (12): 3675–81.
- Dorai-Raj, Sundar. 2014. *Binom: Binomial Confidence Intervals for Several Parameterizations*. <https://CRAN.R-project.org/package=binom>.
- Foti, Maria, Antonietta Mascetti, Vittorio Fisichella, Egidio Fulco, Bianca Maria Orlandella, and Francesco Lo Piccolo. 2017. "Antibiotic Resistance Assessment in Bacteria Isolated in Migratory Passeriformes Transiting Through the Metaponto Territory (Basilicata, Italy)." *AVIAN RESEARCH* 8 (October). <https://doi.org/10.1186/s40657-017-0085-2>.
- Foti, Maria, Donatella Rinaldo, Annalisa Guercio, Cristina Giacopello, Aurora Aleo, Filomena De Leo, Vittorio Fisichella, and Caterina Mammina. 2011. "Pathogenic Microorganisms Carried by Migratory Birds Passing Through the Territory of the Island of Ustica, Sicily (Italy)." *AVIAN PATHOLOGY* 40 (4): 405–9. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.588940>.
- Foti, Maria, Antonino Siclari, Antonietta Mascetti, and Vittorio Fisichella. 2018. "Study of the Spread of Antimicrobial-Resistant Enterobacteriaceae from Wild Mammals in the National Park of Aspromonte (Calabria, Italy)." *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY* 63 (October): 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.016>.
- Gelman, Andrew, Jennifer Hill, and Aki Vehtari. 2020. *Regression and Other Stories*. Cambridge University Press.
- Gelman, Andrew, Daniel Lee, and Jiqiang Guo. 2015. "Stan: A Probabilistic Programming Language for Bayesian Inference and Optimization." *Journal of Educational and Behavioral Statistics* 40 (5): 530–43.
- Giacopello, Cristina, Maria Foti, Antonietta Mascetti, Fabio Grosso, Deborah Ricciardi, Vittorio Fisichella, and Francesco Lo Piccolo. 2016. "Antimicrobial Resistance Patterns of Enterobacteriaceae in European Wild Bird Species Admitted in a Wildlife Rescue Centre." *VETERINARIA ITALIANA* 52 (2): 139–44. <https://doi.org/10.12834/VetIt.327.1374.2>.

- Greig, J., A. Rajic, I. Young, M. Mascarenhas, L. Waddell, and J. LeJeune. 2015. “A Scoping Review of the Role of Wildlife in the Transmission of Bacterial Pathogens and Antimicrobial Resistance to the Food Chain.” *ZOOZOSES AND PUBLIC HEALTH* 62 (4): 269–84. <https://doi.org/10.1111/zph.12147>.
- Gullberg, Erik, Sha Cao, Otto G Berg, Carolina Ilbäck, Linus Sandegren, Diarmaid Hughes, and Dan I Andersson. 2011. “Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations.” *PLoS Pathogens* 7 (7).
- Kindt, Roeland, and Richard Coe. 2005. *Tree Diversity Analysis: A Manual and Software for Common Statistical Methods for Ecological and Biodiversity Studies*. World Agroforestry Centre.
- Knapp, Charles W. 2013. “Patricia L. Keen and Mark Himmelford (Eds): Antimicrobial Resistance in the Environment.” Springer.
- Kohanski, Michael A, Mark A DePristo, and James J Collins. 2010. “Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis.” *Molecular Cell* 37 (3): 311–20.
- Luo, Naidan, Sonia Pereira, Orhan Sahin, Jun Lin, Shouxiong Huang, Linda Michel, and Qijing Zhang. 2005. “Enhanced in Vivo Fitness of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* in the Absence of Antibiotic Selection Pressure.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (3): 541–46.
- Mather, Alison E, Louise Matthews, Dominic J Mellor, Richard Reeve, Matthew J Denwood, Patrick Boerlin, Richard J Reid-Smith, et al. 2012. “An Ecological Approach to Assessing the Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal and Human Populations.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279 (1733): 1630–9.
- Organization, World Health, and others. 2019. “Critically Important Antimicrobials for Human Medicine.”
- Pagano, A, G Nardi, C Bonaccorso, V Falbo, C Passi, V Sanguinetti, and A Mantovani. 1985. “Faecal Bacteria of Wild Ruminants and the Alpine Marmot.” *Veterinary Research Communications* 9 (1): 227–32.
- R Core Team. 2020. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
- Robinson, Timothy P, DP Bu, Juan Carrique-Mas, Eric M Fèvre, Marius Gilbert, Delia Grace, Simon I Hay, et al. 2016. “Antibiotic Resistance Is the Quintessential One Health Issue.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110 (7): 377–80.
- Stan Development Team. 2020. “RStan: The R Interface to Stan.” <http://mc-stan.org/>.
- Turchi, Barbara, Marta Dec, Fabrizio Bertelloni, Stanislaw Winiarczyk, Sebastian Gnat, Flavio Bresciani, Fabio Viviani, Domenico Cerri, and Filippo Fratini. 2019. “Antibiotic Susceptibility and Virulence Factors in

Escherichia Coli from Sympatric Wildlife of the Apuan Alps Regional Park (Tuscany, Italy).” *MICROBIAL DRUG RESISTANCE* 25 (5): 772–80. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0191>.

Vittecoq, Marion, Sylvain Godreuil, Franck Prugnolle, Patrick Durand, Lionel Brazier, Nicolas Renaud, Audrey Arnal, et al. 2016. “Antimicrobial Resistance in Wildlife.” *JOURNAL OF APPLIED ECOLOGY* 53 (2): 519–29. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12596>.